ПАРАЗИТОЛОГИЯ, VIII, 6, 1974

УДК 576.893.19

ПОЛИСАХАРИДЫ В СПОРАХ МИКСОСПОРИДИЙ СЕМ. MYXOBOLIDAE

С. А. Подлипаев

Кафедра зоологии беспозвоночных
Ленинградского государственного университета
и Мурманский морской биологический институт АН СССР

Рассмотрены возможность обнаружения йодофильной вакуоли с помощью фазово-контрастной микроскопии. Описаны результаты обработки спор *M. mülleri*, *M. bramae*, *M. dispar*, *M. albovi*, *M. exiguus*, *M. nemeczeki*, *Thelohanellus oculi-leucisci*, *Henneguya psorospermica* жидкостью Люголя, по реакции PAS и методом Шабадаша (1949). Обсуждаются процессы накопления полисахаридов по мере созревания споры и их расходования при пребывании споры во внешней среде. Поддержано мнение о реальности йодофильной вакуоли как морфологического образования в споре *Myxobolidae*.

В амебоидном зародыше многоклеточных спор некоторых миксоспоридий еще в прошлом веке была обнаружена вакуоль (Müller, 1841a, 1841b, 1841c; Bütschli, 1881), которая вследствие хорошей окрашиваемости йодсодержащими реактивами (Thélohan, 1889) получила название йодофильной. В дальнейшем обнаружили, что она содержит какой-то полисахарид, скорее всего гликоген (Kudo, 1918, 1921; Petruschewsky, 1932; Bond, 1937, 1940; Walliker, 1968; Galinsky and Meglitsch, 1970). Вместе с тем в некоторых работах отмечаются трудности выявления полисахаридов в спорах миксоспоридий (Galinsky and Meglitsch, 1970).

Большинство исследователей, изучавших слизистых споровиков и занимавшихся их систематикой, использовали наличие или отсутствие йодофильной вакуоли как важный признак, служащий для выделения семейств, а иногда и таксонов более высокого уровня (Thélohan, 1892; Gurley, 1893; Tripathi, 1948; Meglitsch, 1960; Шульман, 1959, 1966, и др.). Однако в последнее время некоторые ученые полностью отрицают применимость этого признака для целей систематики (Ахмеров, 1960; Walliker, 1966, 1968; Lom, 1969a, 1969b). Таким образом, возникла необходимость более подробного изучения йодофильной вакуоли и в первую очередь методов ее выявления, а также изменений вакуоли в процессе формирования спор и во время пребывания их вне хозяина. Этим вопросам и посвящена настоящая работа.

Автор признателен доктору биологических наук С. С. Шульману за постоянную помощь в работе и ценные советы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили следующие виды: *Henneguya psorospermica*, *Thelohanellus oculi-leucisci*, *Myxobolus bramae*, *M. dispar*, *M. albovi*, *M. exiguus*, *M. nemeczeki*, *M. mülleri*. Живые споры просматривались с применением фазово-контрастного устройства. Для изготовления препаратов из живых спор использовался глицерин-желатин. Раствором Люголя обрабатывались споры представителей всех названных видов.

Наиболее полная для данной пробы спор окраска достигается в течение 10—15 мин.

Гистохимической обработке был подвергнут весь материал (обычно цисты). Фиксация осуществлялась немедленно после вскрытия рыбы, для чего применялись жидкость Буэна на нейтральном формалине, фиксатор Карнуа, смесь девяти частей абсолютного спирта и одной части формалина, а также фиксатор Шабадаша (1949). После фиксации материал заливался в парафин или обычным способом, или через метилбензоат и бензол. Контроль производился воздействием слюны на депарафинированные срезы при температуре 37° в течение 30—40 мин. Далее проводилась реакция PAS (Пирс, 1962) и обработка по методике Шабадаша (1949). Обе методики оказались вполне удовлетворительными для миксоспоридий и дали идентичные результаты.

Для изучения изменений йодофильной вакуоли при пребывании спор вне хозяина из цист, взятых с жабер, приготавливалась взвесь спор в воде. Споры хранились при температурах —5, +3, +18°. В некоторых случаях одна взвесь спор была разделена на две части, которые помещались в разные температурные условия или сразу после приготовления, или через некоторое время после начала опыта. В дальнейшем споры обрабатывались жидкостью Люголя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Споры миксоспоридий в настоящее время, в особенности в нашей стране, почти во всех случаях изучаются с применением фазово-контрастного устройства (Донец и Шульман, 1973); однако определение и описание строения спор очень редко проводят на живом материале. Обычно изготавливают глицерин-желатиновые препараты, которые просматривают по истечение некоторого времени. Йодофильная вакуоль при этом, как правило, выглядит светлым гомогенным пятном.

Проведенное исследование показало, что в живых спорах *M. mulleri* выявить йодофильную вакуоль с помощью фазового контраста почти никогда не удается, хотя она прекрасно видна при обработке спор жидкостью Люголя. При воздействии соляной кислоты на споры, обработанные жидкостью Люголя, окраска вакуоли исчезает. На глицерин-желатиновых препаратах, приготовленных из того же материала, вакуоль, правда неясно выраженная, видна у многих спор через 10—15 дней. Через 2—4 месяца на тех же стеклах почти каждая спора имеет прекрасно очерченную йодофильную вакуоль

Следует заметить, что в спорах *Henneguya psorospermica* вакуоль часто остается плохо заметной и после длительного хранения их в глицерин-желатине.

На препаратах, для приготовления которых употреблялся глицерин-желатин без карболовой кислоты, вакуоль обнаруживается много позже, чем на глицерин-желатиновых препаратах с карболовой кислотой.

Изложенные данные позволяют предположить, что в спорах, заключенных в глицерин-желатин (особенно в присутствии кислоты), происходит гидролиз полисахаридов йодофильной вакуоли («вымывание»), после чего она становится заметной при использовании фазово-контрастного устройства, а в ряде случаев и без него. Не исключена возможность и ферментативного гидролиза гликогена (Шабадаш, 1949).

Проведенные гистохимические реакции показали, что в спорах исследованных видов присутствуют полисахариды по меньшей мере двух типов: связанные преимущественно с амебоидным зародышем и растворяющиеся при действии слюны, т. е. близкие к гликогену и расположенные вблизи полярных капсул в виде мелких гранул и не исчезающие после обработки слюной, что указывает на их отличие от гликогена. Локализация околокапсулярных гранул за пределами амебоидного зародыша, единственной нормально функционирующей клетки многоклеточных спор миксоспоридий, говорит в пользу того, что они не принимают активного участия в обмене веществ. Судя по расположению, околокапсулярные гранулы представляют собой остатки полисахаридных включений цитоплазмы капсулогенной клетки.

При обработке спор *Myxobolus pfeifferi* жидкостью Люголя, обычно выявляющей только йодофильную вакуоль, Кейсселитц (Keysselitz,1908) заметил между полярными капсулами небольшую окрашенную область с неправильными очертаниями. Нам тоже удалось заметить подобное образование в спорах *M. ellipsoides* из линя (*Tinca tinca*).

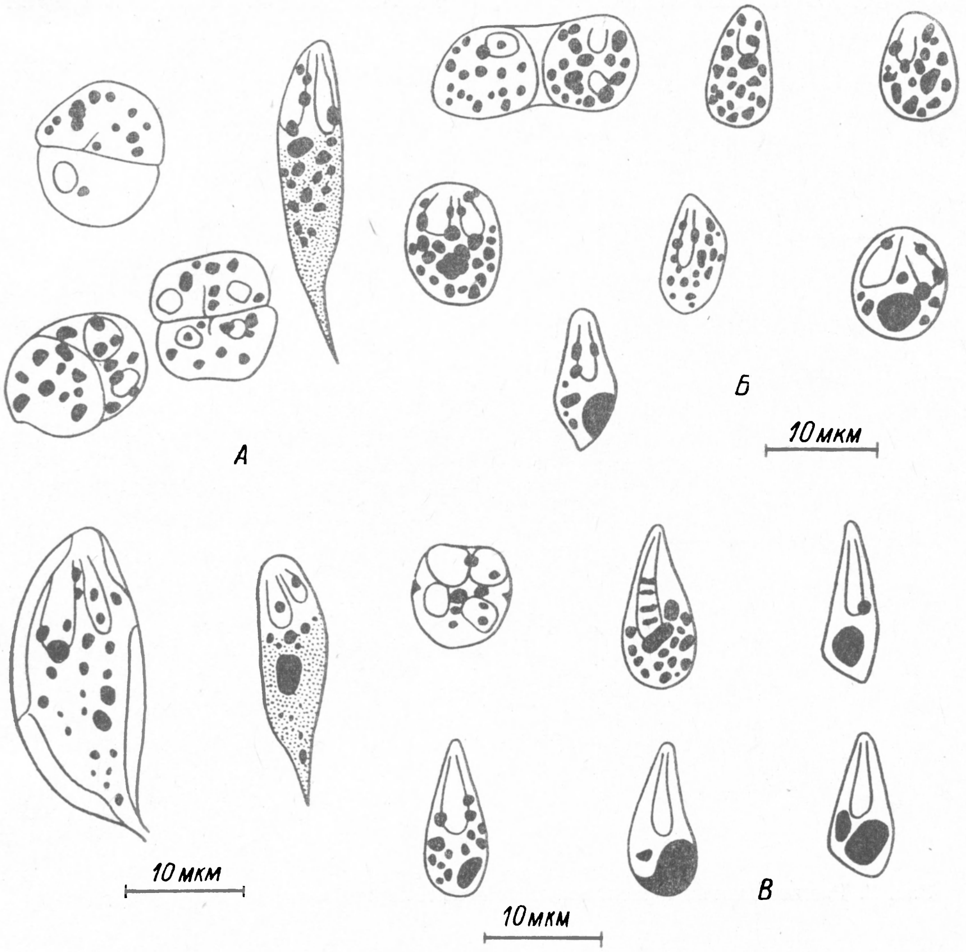

Рис. 1. Полисахариды в развивающихся спорах.

А — *Henneguya psorospermica*; *Б* — *Myxobolus mulleri*; *В* — *Thelohanellus oculi-leucisci*.

Учитывая достаточную специфичность примененных для выявления гликогена методик и совпадение результатов, достигнутых с их помощью, можно с большой долей вероятности предполагать, что амебоидный зародыш содержит в своем составе гликоген или близкий к нему полисахарид.

В амебоидных зародышах спор *Henneguya psorospermica* полисахариды располагаются или в виде довольно крупных гранул, или диффузно (рис. 1, *А*). В отдельных случаях четко выделяется ярко окрашенная вакуоль. Споры *Thelohanellus oculi-leucisci*, как правило, обладают вакуолью, однако иногда в амебоиде лежат несколько крупных глыбок полисахаридов (рис. 1, *В*).

Различные типы расположения полисахаридов в спорах *M. mülleri* показаны на рис. 2. Споры одной из цист *M. mülleri* имели йодофильную вакуоль, в которой на ярком фоне были разбросаны более светлые участки. В нескольких случаях отмечалась более бледная окраска йодофильной вакуоли по сравнению с амебоидным зародышем. Аналогичная картина наблюдалась и в некоторых спорах *Henneguya psorospermica*. Соотношение между числом спор с различным содержанием и расположением полисахаридов может довольно сильно разниться в отдельных случаях. В зрелых цистах большинство (80—90%) составляют споры с окрашенной йодофильной вакуолью. Остальные споры в основном содержат полисахариды в виде глыбок.

Расположение полисахаридов в спорах других рассмотренных видов рода *Myxobolus* мало отличается от описанного для *M. mülleri*. В цистах *M. nemeczeki* имеется большое количество спор со средних размеров грануляций и сравнительно малое количество спор с ясно очерченной йодофильной вакуолью. Заметим, что *M. nemeczeki* относится в пределах рода *Myxobolus* к числу видов, споры которых имеют одну из самых маленьких и плохо заметных йодофильных вакуолей, что в свое время послужило причиной для включения его в род *Myxosoma* (*M. lobatum* Nemeczek, 1911).

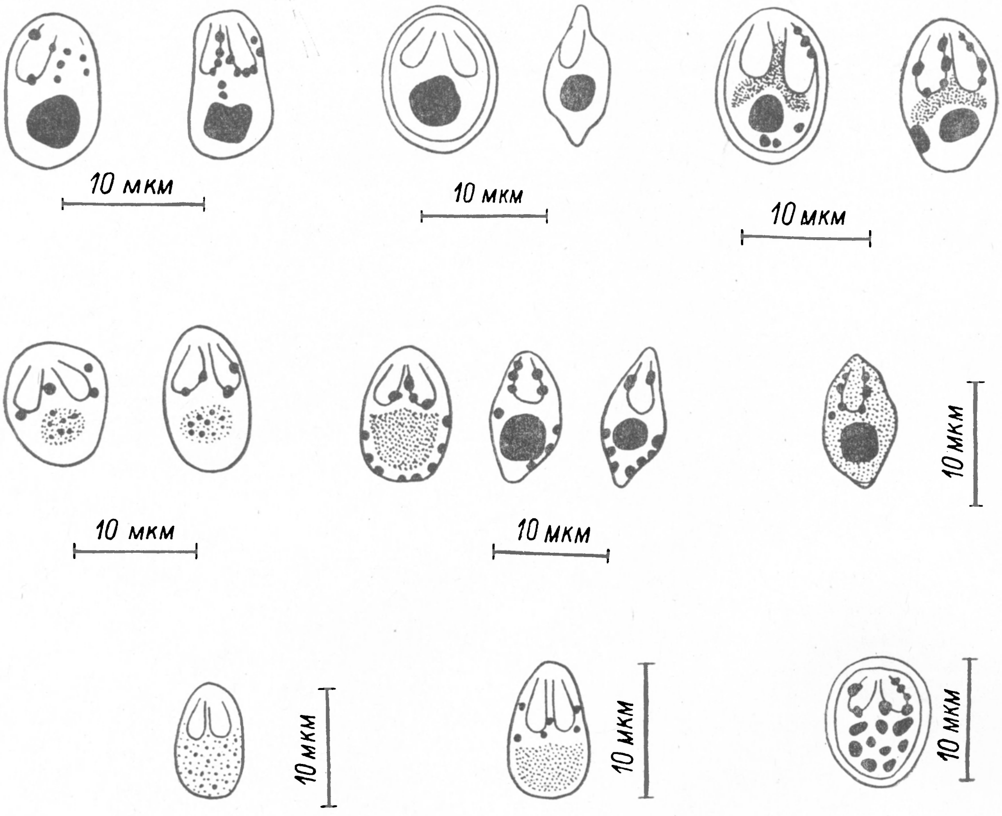

Рис. 2. Различные типы расположения полисахаридов в спорах *Myxobolus mülleri*.

Интересно сравнить между собой различные методы обнаружения йодофильной вакуоли по отношению к спорам одной и той же цисты *M. mülleri*. У живых спор при наблюдении под фазово-контрастным устройством йодофильная вакуоль не была видна. В то же время жидкость Люголя окрасила ее у 54.5% спор, методом PAS йодофильная вакуоль выявилась у 85.2% спор. Наконец, на глицерин-желатиновых препаратах через 6 месяцев она была обнаружена при помощи фазово-контрастной микроскопии у 92% спор. Трудности изучения йодофильной вакуоли объясняются, по всей вероятности, в основном сложной картиной ее изменений на протяжении жизни споры. Состояние и количество полисахаридов в споре, несомненно, связаны со степенью ее зрелости. Уже Кейсселитц (Keysselitz, 1908) заметил, что йодофильная вакуоль появляется лишь на определенном этапе формирования споры. Бонд (Bond, 1940) вскользь упоминает, что более крупными глыбками гликогена обладают, по-видимому, более зрелые споры.

Мы также попытались установить связь между количеством и состоянием полисахаридов споры и степенью ее зрелости. Данная задача облегчается тем, что у многих миксоспоридий зрелые споры занимают преимущественно центральную часть цисты, а незрелые, равно как и панспоробласты, находятся на ее периферии.

Количество включений полисахаридов в спорobластах с течением времени увеличивается. По мере формирования споры полисахариды образуют в ней все более и более крупные глыбки, постепенно концентрируясь в йодофильной вакуоли. Хорошей иллюстрацией этому служат *Hennegyua psorospermica* (рис. 1, *А*). *Myxobolus mülleri* (рис. 1, *Б*) и *Thelohanellus oculi-leucisci* (рис. 1, *В*).

Обычно, говоря о воздействии на споры миксоспоридий жидкости Люголя, отмечали лишь факт наличия или отсутствия вакуоли. Галинский и Меглич (Galinsky and Meglitsch, 1970) обратили внимание на то, что различные споры *Henneguya exilis* окрашиваются по-разному. Они показали, что с течением времени возрастает число спор с более или менее равномерно окрашивающимся жидкостью Люголя амебоидным зародышем и уменьшается число спор с четко выраженной йодофильной вакуолью.

По степени и характеру окраски свежих спор жидкостью Люголя среди них можно выделить три типа: 1) споры, у которых йодофильная вакуоль хорошо окрашивается; 2) споры, у которых весь амебоидный зародыш окрашивается диффузно; 3) споры совсем не окрашиваются. Просмотр препаратов показал, что с течением времени количество спор с четко выраженной йодофильной вакуолью постепенно уменьшается, а количество спор с диффузной окраской амебоидного зародыша увеличивается. Реакция PAS обнаруживает аналогичные различия между окраской свежих спор и спор, пробывших некоторое время вне хозяина. В конечном итоге большинсто спор перестает окрашиваться и разрушается. Указанные изменения в спорах, хранящихся при различных температурах, прослежены для *Myxobolus albovi* (табл. 1), *M. cyprinicola* (табл. 2) и *M. mülleri* (табл. 3, 4).

В первые 3—4 дня опыта увеличению числа спор с диффузной окраской амебоидного зародыша соответствует пропорциональное уменьшение числа спор с четкой йодофильной вакуолью. Это соответствие лишь слегка нарушается незначительным числом неокрашивающихся спор. Так как изменение числа спор с четкой йодофильной вакуолью достаточно полно характеризует весь процесс на ранних его этапах, то для *M. mülleri* в табл. 4 приведен только этот параметр. При более длительном проведении опыта на 5—6-е сутки количество неокрашивающихся спор резко возрастает,

Таблица 1

Изменение количества спор *Myxobolus albovi* с различными типами окраски жидкостью Люголя в процессе хранения при температурах +18° и —5° (молодая циста)

Количество суток	Температура							
	+18°				—5°			
	общее количество спор	количество спор (в %)			общее количество спор	количество спор (в %)		
		с четкой вакуолью	с диффузной окраской	неокрашенные		с четкой вакуолью	с диффузной окраской	неокрашенные
0	388	82.0	17.4	0.6	388	82.0	17.4	0.6
1	352	71.0	27.8	1.2	202	76.5	23.5	1.0
3	154	9.8	85.0	5.2	162	52.0	47.5	0.5
5	107	3.0	90.5	6.5	123	74.0	26.0	—

Таблица 2

Изменение количества спор *Myxobolus cyprinicola* с различными типами окраски жидкостью Люголя в процессе хранения при температурах +18° и +3°

Количество суток	Температура							
	+18°				+3°			
	общее количество спор	количество спор (в %)			общее количество спор	количество спор (в %)		
		с четкой вакуолью	с диффузной окраской	неокрашенные		с четкой вакуолью	с диффузной окраской	неокрашенные
0	313	65.0	35.0	—	—	—	—	—
1	236	57.0	42.0	1.0	—	—	—	—
3	223	9.4	90.6	—	214	43.0	56.0	1.0

отражая гибель большинства спор, которые в конце концов разрушаются (табл. 3).

Приведенные данные показывают, что полисахариды йодофильной вакуоли с течением времени переходят в цитоплазму амебоидного зародыша. Скорее всего это связано с транспортом запасных питательных веществ в амебоидный зародыш, где, по-видимому, происходит их утилизация. Аналогичного мнения придерживаются Галинский и Меглич (Galinsky and Meglitsch, 1970).

Таблица 3

Изменение количества спор *Myxobolus mülleri* с различными типами окраски жидкостью Люголя в процессе хранения при температуре +18° (молодая циста)

Количество суток	Общее количество спор	Количество спор (в %)		
		с четкой вакуолью	с диффузной окраской	неокрашенные
0	279	86.0	11.1	2.9
3	135	5.9	89.0	5.1
4	139	3.6	88.5	7.9
6	125	—	69.5	30.5

В двух пробах, содержавшихся при низкой температуре, имело место увеличение количества спор с четкой йодофильной вакуолью на 5-й день после начала опыта. В одной пробе, находившейся при комнатной температуре, такое увеличение наблюдалось в первый день (табл. 4). По данным Галинского и Меглича (Galinsky and Meglitsch, 1970), среди спор, содержавшихся при комнатной температуре, через 24 часа тоже обнаруживается увеличение количества спор с четко выраженной йодофильной вакуолью; аналогичное явление имело место и в том случае, когда предварительно замороженные споры в течение недели находились при комнатной температуре. Эти факты, вероятно, можно объяснить, предположив, что в цистах слизистых споровиков споры созревают неодновременно, и что в ходе опыта продолжается процесс накапливания полисахаридов в несозревших спорах. Тогда может случиться так, что количесто спор, к данному моменту времени достигающих зрелости, превысит число спор, у которых полисахариды йодофильной вакуоли за то же время переместились в цитоплазму амебоидного зародыша. Процесс «созревания» спор сильно замедляется при низких температурах и поэтому обнаруживается при наблюдении через суточные интервалы. При комнатной температуре он протекает, по-видимому, настолько быстро, что необходимы значительно более дробные

Таблица 4

Изменение количества сцор *Myxobolus mülleri* с четко окрашивающейся жидкостью Люголя йодофильной вакуолью в процессе хранения при температурах +18° и +3°

Зрелая циста					Зрелая циста			Молодая циста		
+3°			+18°		+18°			+3°		
количество суток	общее количество спор	количество спор с вакуолью (в %)	общее количество спор	количество спор с вакуолью (в %)	количество суток	общее количество спор	количество спор с вакуолью (в %)	количество суток	общее количество спор	количество спор с вакуолью (в %)
0	203	59.0	—	—	0	202	54.5	0	279	86.0
1	217	26.0	—	—	1	349	59.0	3	101	77.2
3	269	24.0	—	—	2	206	10.2	4	146	77.0
4	240	31.0	—	—	5	342	5.8	5	120	71.5
5	231	37.0	301	20.0	6	64	—	—	—	—
7	212	12.5	262	19.5	7	114	1.76	—	—	—
—	—	—	—	—	9	171	—	—	—	—

сроки измерений. Расходование полисахаридов йодофильной вакуоли начинается, вероятно, не с момента попадания споры в воду или выхода амебоидного зародыша в пищеварительный тракт хозяина, а раньше, еще в цисте. Действительно спор, содержащих четко окрашенную йодофильную вакуоль, в молодых цистах больше, чем в зрелых (82—86 и 54.5—59% соответственно). По-видимому, спора, сформировавшись и потеряв связь с панспоробластом, начинает расходовать собственные полисахариды.

Поскольку йодофильная вакуоль — реально существующий органоид, играющий большую роль в жизнедеятельности споры, ее нельзя не использовать в систематике миксоспоридий.

Литература

Ахмеров А. Х. 1960. Миксоспоридии рыб бассейна реки Амур. Рыбн. хоз. внутр. водоемов Латв. ССР, 5 : 240—307.

Донец З. С. и Шульман С. С. 1973. О методах исследования Myxosporidia (Protozoa, Cnidosporidia). Паразитол., 7 (2) : 191—193.

(Петрушевский Г. К.) Petruschewsky G. K. 1932. Zur Systematik und Cytologie der Myxosporidia aus einigen Fischen des Weissen Meer. Arch. Protistenk., 78 (3) : 543—556.

Пирс Э. 1962. Гистохимия. И. Л., М., 2-е изд.: 1—963.

Шабадаш А. Л. 1949. Проблемы гистохимического исследования гликогена нормальной нервной системы. Опыт характеристики биологических свойств и различий нейронов. Медгиз. М. : 1—322.

Шульман С. С. 1959. Новая система миксоспоридий. Тр. Карельск. фил. АН СССР, 14. Вопр. паразитол. Карелии: 33—47.

Шульман С. С. 1966. Миксоспоридии фауны СССР. «Наука», М.—Л. : 1—507.

Bond F. F. 1937. A probable constituent of the spore coat of Myxosporidian spores. J. Parasitol., 23 : 542—543.

Bond F. F. 1940. Glycogenous material in Myxosporidian spores. J. Parasitol., 39 (Suppl): 29.

Bütschli O. 1881. Myxosporidien. Zool. Jahrbericht f. 1880, 1 : 162—164.

Galinsky D. and P. Meglitsch. 1970. Notes on the effect of pretreatment of spores on the jodinophile vacuole of Henneguya exilis. Proc. Yowa Acad. Sci., 76 : 431—435.

Gurley R. R. 1893. On the classification on the Myxosporidian a group of Protozoon parasites infesting Fisches. Bull. U. S. Fisch. Comm., 11 (1891) : 402—407.

Keysselitz G. 1908. Die Entwicklung von Myxobolus pfeifferi Th. Teil I u. II. Arch. Protistenk., 11 : 252—308.

Kudo R. 1918. Contributions to the study of parasitic Protozoa. IV. Note on some Myxosporidia from certain fish in the viciniti of Woods Hole. J. Parasitol., 5 : 11—16.

Kudo R. 1921 On the nature of structure characteristic of Cnidosporidian spores. Trans. Amer. Microscop. Soc., 11, 2 : 59—74.

Lom J. 1969a. On a new taxonomic character in Myxosporidia, as demonstradet in descriptions of two new species of Myxobolus. Folia. Parasitol., 16 : 97—103.

Lom J. 1969b. Myxobolus undulatus sp. n. a new Myxosporidian from minows (Phoxinus phoxinus). Folia Parasitol., 16 : 296.

Meglitsch P. 1960. Some Coelozoic Myxosporidia from New Zealand Fisches. I. General and Family Ceratomyxidae. Trans. Roy. Soc. New. Zealand, 88, 2 : 265—365.

Müller J. 1841a. Krankhafter Hautausschlag mit speefisch organisierten Körperchen (Psorospermien). Ber. preuss. Acad. Wiss. Berlin : 212—221.

Müller J. 1841b. Ueber eine eigentümliche Krankhafte parasitische Bildung mit specifich organisierten Samenkörperchen. Ber. d. Preus. Acad. Wissensch. : 246—250.

Müller J. 1841c. Ueber Psorospermien. Arch. Anat., Physiol. u. Wissensch. Med., 5 : 477—496.

Thélohan P. 1889. Sur la constitution des Spores des Myxosporidies. C. r. Acad. Sci., 109 : 919—922.

Thélohan P. 1892. Observation sur les myxosporidies et éssai de classification de ces organismes. Bull. Soc. Philom, 4 : 165—178.

Tripathi Y. R. 1948. Some new Myxosporidia from Plymouth with a proposed new classification of the order. Parasitol., 39 (1—2) : 110—118.

Walliker D. 1966. Some protozoan parasites of the roach (Rutilus rutilus). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60 : 13.

Walliker D. 1968. The Nature of the jodinophilous vacuole of Myxosporidien Spores and a Proposal tu Synonimize the Genus Myxosoma Thélohan, 1892 with the Genus Myxobolus Bütschli, 1882. J. Protozool., 15 (3) : 571—575.

POLYSACCHARIDES IN SPORES OF MYXOSPORIDIANS OF THE FAMILY MYXOBOLIDAE

S. A. Podlipaev

SUMMARY

The paper deals with the ways of discovery of the iodinophilous vacuole in spores of myxosporidians of the family *Myxobolidae.* Phase-contrast microscopy reveals the vacuole only after a certain period of time. The results of the treatment of spores of *Myxobolus mülleri*, *M. bramae*, *M. dispar*, *M. albovi*, *M. exiguus*, *M. nemeczeki*, *Thelohanellus oculi-leucisci* and *Henneguya psorospermica* with lugol, the PAS reaction and following the A. L. Shabadash method are discussed. During a spore formation the number of polysaccharides in it increases. When spores are outside of the host polysaccharides of the iodinophilous vacuole are gradually used. The iodinophilous vacuole is regarded as a depot of reserve nutrient such as glycogen in a spore. The opinion is supported on the reality of the iodinophilous vacuole as a morphological formation in spores of *Myxobolidae* and the necessity to use it in the systematics.